

苧麻 CCoAOMT 基因全长 cDNA 克隆与序列分析

陈建荣^{1,3}, 郭清泉¹, 张学文²

(¹湖南农业大学苧麻研究所, 长沙 410128; ²湖南农业大学生物技术系, 长沙 410128; ³中国农业科学院麻类研究所, 长沙 410205)

摘要: 【目的】试图分离和克隆苧麻内源咖啡酰辅酶 A 甲基转移酶基因。【方法】采用 RACE 技术克隆基因, 对序列应用 ClustaW 1.82 软件进行在线分析, 将苧麻 mRNA 序列、mRNA 编码区序列以及氨基酸序列与已报道的其它植物的相应序列进行多重序列排列比较并构建系统树。【结果】获得了苧麻 CCoAOMT cDNA 全长序列 (GenBank 注册号: AY651026); 苧麻咖啡酰辅酶 A 甲基转移酶是氧甲基转移酶类; 苧麻 CCoAOMT 基因 mRNA 序列与已报道的其他植物的相应序列不能聚为一类, 其差异明显大于其它植物间的差异。苧麻 CCoAOMT 基因 mRNA 编码区序列与玉米 (*Zea mays*: ZMA242980、ZMA242981) 的同源性高于其他植物。推导的苧麻 CCoAOMT 酶蛋白氨基酸序列与杨树 (*Populus balsamifera*: AJ224894、AJ224896)、美洲山杨 (*Populus tremuloides*: PTU27116) 的同源性高于其他植物。【结论】苧麻 CCoAOMT 基因 cDNA 与其它植物的相应序列具有同源性。

关键词: 苧麻 (*Boehmeria nivea*); 咖啡酰辅酶 A 甲基转移酶; 全长 cDNA; 基因克隆; 序列分析

Cloning Full Length of Ramie Caffeoyl-CoA 3-O-Methyltransferase cDNA and Sequence Analysis

CHEN Jian-rong^{1,3}, GUO Qing-quan¹, ZHANG Xue-wen²

(¹Institute of Ramie, Hunan Agricultural University, Changsha 41012; ²Departement of Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128; ³Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410205)

Abstract: 【Objective】 The full length of ramie (*Boehmeria nivea*) caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase cDNA was cloned. 【Method】 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) method was used to analyze the sequence by ClustaW 1.82 software on line. 【Result】 The full length of ramie caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase cDNA was cloned for the first time (GenBank accession number: AY 651026). The result of domain analyze showed that it is a member of O-methyltransferases family. Compared ramie mRNA sequence, mRNA CDS sequence and putative amino acid sequence CCoAOMT to other higher plants, phylogenetic tree of CCoAOMT was generated by multiple alignment. The result displayed that mRNA level of ramie can not be clustered into any other plant, but the result showed that ramie and *Zea mays* (ZMA242980, ZMA242981) have higher homology in mRNA CDS than other higher plants, while the amino acid sequence of ramie and populus (AJ224894, AJ224896, PTU27116) has higher homology than other plants. 【Conclusion】 Ramie (*Boehmeria nivea*) caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase cDNA has homology with that of other plants.

Key words: Ramie (*Boehmeria nivea*); Caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase; Full length cDNA; Gene cloning; Sequence analysis

0 引言

【本研究的重要意义】苧麻是中国重要的纤维植物, 原麻含木质素 1%~5%^[1], 是工厂脱胶时难以去除的成分, 木质素的存在对苧麻纺织性能和纤维品质

有较大影响。通过基因工程技术有目的地调控纤维素与木质素的比例, 降低木质素的含量或改变其组分, 改良苧麻品质进行低木质素育种, 将是苧麻遗传育种改良非常有前景的领域。【前人研究进展】目前国内外通过转基因技术调控植物木质素含量与组分的研究进

收稿日期: 2005-04-26; 接受日期: 2005-11-29

基金项目: 湖南省自然科学基金项目 (03JJY3046), 湖南省教育厅重点项目 (01A006), 国家“863”资助项目 (2001AA241211, 2004AA241210) 和湖南省重大科技专项 (03NK1001)

作者简介: 陈建荣 (1973-), 女, 侗族, 湖南芷江人, 博士研究生, 研究方向为作物遗传育种与基因工程。Tel: 0731-8998511; E-mail: janro@163.com。通讯作者郭清泉 (1957-), 男, 湖南长沙人, 教授, 博士生导师, 研究方向为作物遗传育种。E-mail: qingqg@yahoo.com

展迅速, 多个木质素生物合成代谢中的关键酶基因已经被分离克隆。咖啡酰辅酶 A 甲基转移酶 (caffeoyl-CoA3- O-methyl-transferase, CCoAOMT) 是其中的一个^[2, 3]。Ye 等在百日草中首次证实 CCoAOMT 参与木质素的生物合成的功能^[4, 5], 国内外研究表明抑制 CCoAOMT 表达的转基因烟草和杨树等植物的木质素含量下降, 同时伴随 S/G 比值增加, 木质素结构更为疏松, 易于去除, 并没有出现非正常生长^[6~11]。【本研究切入点】植物木质素代谢关系到纤维的产量和质量的问题, 研究韧皮纤维植物的木质素代谢利于定向改良纤维品质。关于苎麻木质素合成代谢中的基因都尚未见报道, 开创此研究便于更好得利用麻类纤维。

【拟解决的关键问题】本研究分离和克隆苎麻内源咖啡酰甲基转移酶基因, 为深入研究苎麻内源 CCoAOMT 基因表达特征及其编码蛋白在苎麻木质素代谢中的功能提供理论依据, 对于探明苎麻木质素的生物合成及代谢机理具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 材 料

苎麻 *Boehmeria nivea* (Linn.) Gaud. 栽培种湘苎 3 号。

1.2 苎麻 CCoAOMT 基因全长 cDNA 序列的克隆

本研究采用 BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (BD Biosciences Clontech), 在使用说明书的基础上, 根据实验具体情况改良后的方法进行 RACE cDNA 扩增。

1.3 RACE 引物的设计

根据本研究已经获得的苎麻 CCoAOMT 基因核心序列(GenBank 登录号 AY651026), 设计基因特异引物 GSP1、GSP2。两引物间的序列约为 300 bp, 在 RACE 系列反应中可用作阳性对照。

GSP1:5'AGCCATGGTACTTTCCGTCTTCGAT3';
GSP2:5'GGAATTTGATGACGACGTCAGCAGA3'

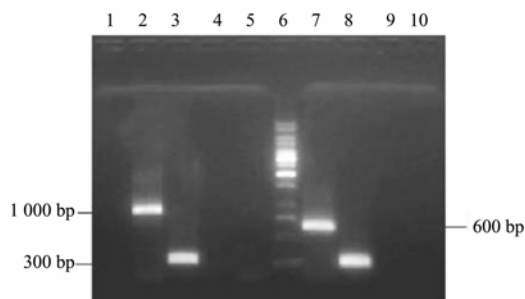
1.4 DNA 测序及核苷酸序列生物信息学分析

将 3'-RACE 产物、5'-RACE 产物分别用 pMD18-T 载体连接, 经 Amp 抗性筛选、X-gal/IPTG 蓝白斑显色筛选、菌落 PCR 筛选、重组质粒 PCR 鉴定、重组质粒的酶切初步鉴定后, 取穿刺保存的菌种送生物技术公司使用 M13 primers 进行双向测序。将测序结果拼接, 得到序列与 GenBank/DDBJ/EMBL 数据库进行生物信息学分析。在线进行保守区域分析和开放阅读框 (ORF) 与编码蛋白质分析 (<http://www.expasy.org/cgi-bin/protparam>)。应用 ClustalW 1.82 软件([\[ebi.ac.uk/cgi-bin/clustalw/\]\(http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/clustalw/\)\), 将苎麻 CCoAOMT 基因在 3 种水平即基因的 mRNA 序列 \(包括 3'UTR、5'UTR 和编码区序列\)、mRNA 编码区序列以及推导的氨基酸序列进行多序列比较构建系统树。](http://www.</p>
</div>
<div data-bbox=)

2 结果与分析

2.1 苎麻 CCoAOMT 基因全长 cDNA 序列的克隆

cDNA 末端的克隆结果见图 1。以 5'-RACE-Ready cDNA 为模板, GSP1 与 UPM 为引物扩增得到约 600 bp 的条带(泳道 7)。以 3'-RACE-Ready cDNA 为模板, GSP2 与 UPM 为引物扩增得到约 1 000 bp 的条带(泳道 2)。阳性对照的反应以 5'-RACE-Ready cDNA、3'-RACE-Ready cDNA 为模板, 以 GSP1、GSP2 为引物都扩增到与预期大小相同的约 300 bp 的条带(泳道 3,8); 阴性对照中都没有扩增。



1. PCR 空白对照(没有模板); 2. 3'-RACE 产物; 3. 3'-RACE 阳性对照; 4,5. 3'-RACE 阴性对照; 6. DNA 分子量标准(GeneRuler™ 1kb ladder); 7. 5'-RACE 产物; 8. 5'-RACE 阳性对照; 9, 10. 5'-RACE 阴性对照
1. PCR blank control; 2. 3'-RACE result; 3. positive control of 3'-RACE; 4, 5. negative control of 3'-RACE; 6. molecular marker (GeneRuler™ 1 kb ladder); 7. 5'-RACE result; 8. positive control of 5'-RACE; 9, 10. negative control of 5'-RACE

图 1 5'-RACE、3'-RACE 反应结果

Fig.1 5'-RACE, 3'-RACE sample results

2.2 cDNA 末端扩增产物测序及核苷酸序列生物信息学分析

2.2.1 测序结果与序列分析 将 5'-RACE 产物测序结果与 3'-RACE 产物测序结果进行 BLAST 2 SEQUENCE 同源性比较分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq>), 基于重叠区序列, 拼接为苎麻 CCoAOMT 基因全长 cDNA 序列 1080 bp, 其中起始密码子 ATG 位于第 124~126 bp, 终止密码子 TAA 位于第 865~867 bp (图 2)。

在线进行保守区域分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)。结果表明, 苎麻咖啡酰

辅酶 A 甲基转移酶是属于 pfam01596, Methyltransf_3, 氧甲基转移酶。此基因家族的成员为氧甲基转移酶, 包括儿茶酚-O-甲基转移酶, 咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶和一个细菌氧甲基转移酶家族, 可能参与抗生物素的产生。

```

1.....ACGGGGGAA TTCAGGATCA GAACAAACT GTGTGTCTCT TCCCTGAATA TCACCAAACT
61....CAAACAAA CCCAAAACA CAAAAAATA AAAAAAATC TCAAAATTC TAAATCACAA
121...GAAATGGCCA ACAACGGAGA AGGAAGCAA ACGAGGATCA GCAGGACCA GGAGGTGGGT
181...CACAGAGCC TCTCTAGAG CGAGGCTCTC TACAGTATA TTTTGGAGC TAGCCTTAC
241...CCGAGAGGC CTGACTTAT GAAGGAGCTC AGGAGATCA CAGTAAGCA TCCATGGAAT
301...TTGATGAGCA CGTACAGCA CGAGGCCAG TCTCTAGCA TGCTCCTAA CACTATCAAT
361...GCCAAAAACA CCATGGAGAT CGGCGTCTTC ACCGCTACT CTCTCTCGC CACCGCCCTC
421...GCTCTTCCC AGCAGCGAAA GATATTGGCC ATGGACATCA ACAGAGAGA CTATAAATG
481...GGCTTCCCG TGATCGAAA GGCCGGTCTC GCCACAAGA TTGACTTCA AGAGGGCCCA
541...GCTCTCCCG CTCTTGAACA AATGATGAAA GAGCGAAGT ACCATGGCTC CATTGACTTC
601...ATATTGTGG ATCGTGACA GGACAATAC TTGACTACT ACAAGAGCT GATTGACTCG
661...GTCAGGTGG GAGCGGTGAT TGCTACGACA AACACCTAT GGAATGGCTC CGTGTGGCA
721...CCACCCGAG CGCCCTCCG CAAGTACGTT AGTACTACA GAGATTCTG GCTCGACTCG
781...AACCAAGGCC TCGCTGAGA CCCCAGCAT CGGATTTGCA TCCCTCCCG CGGCGATGGG
841...ATCCCCATC GCCCGCGGT TAGCTAAATA CCACTATCTC TTGCCCGCC TAATAATGTA
901...AAAAAATG ATCATGATA TTTTAAAA AGAATATTC TTTGCCCTTC GAAATGTTTT
961...TTTTTTGCT TGATCGAAGA GTGATATCA GTTATTTAG TTTATTGTC ATTGACGGCC
1021..ATGAAAAAT GTTGATCTG GAATTAATAT AAAGTTAGAA TATATCATG TGCTTTAAAA
  
```

图 2 苕麻 CCoAOMT 基因全长 cDNA 序列
Fig.2 Sequence of ramie CCoAOMT full length cDNA

2.2.2 苕麻 CCoAOMT 编码蛋白与蛋白质数据库进行同源性比较结果 将推定的苕麻 CCoAOMT 编码蛋白的 247 个氨基酸序列与蛋白质数据库进行同源性比较 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blastp>)。结果显示, 其与数据库中许多其他植物的咖啡酰辅酶 A 甲基转移酶有高度同源性, 与推定的 *Broussonetia papyrifera* 的咖啡酰辅酶 A 甲基转移酶同源性最高为 96%。多序列比较结果表明, 苕麻与其他多种高等植物的 CCoAOMT 酶蛋白氨基酸序列在系统进化上有高度保守性 (图 4)。

2.2.3 苕麻 CCoAOMT 基因 mRNA 序列比较与分子进化分析 应用 ClustaW 1.82 软件 (<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/clustalw/>), 将苕麻 CCoAOMT 基因 mRNA 序列与已报道的其他植物的相应序列在线进行多序列比较, 并构建系统树 (phylogenetic tree) (图 4)。结果显示, 苕麻 (*Boehmeria nivea*) 的 CCoAOMT 基因 mRNA 序列与已报道的其他植物的相应序列不能聚为一类, 其差异明显大于其他植物间的差异。结果还显示, 同种植物的不同基因序列差异相对比较大, 如烟草 (*Nicotiana tabacum*) 的 3 个序列中 NTU62735 与 AF060180 同源性大于与 AF022775 的同源性。蓝桉 (*Eucalyptus globulus*) 的一个序列 AF046122 与其同属的桉树 (*E.gunnii*) EG12228 同源性相对较高, 但与蓝桉 (*Eucalyptus globulus*) 的另一个基因序列 AF168780 间差异相对较大。同种植物中也有同源性相对较高的基因序列, 如拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的 3 个序列 AY143979、AY057554 与 NM_119566 同源性相对较高; 如玉米 (*Zea mays*) 的 ZMA242980

与 ZMA242981 同源性相对较高。同科属植物的同源性高于与其他科属植物的同源性, 如杨属 3 种植物杨树 (*Populus balsamifera*: AJ224894、AJ224895、AJ224896) 与银白杨 (*Populus alba*: AF327458) 和美洲山杨 (*Populus tremuloides*: PTU27116); 桉属的蓝桉 (*Eucalyptus globulus*: AF046122) 与桉树 (*E.gunnii*: EG12228); 茄科的马铃薯 (*Solanum tuberosum*: AB061268)、烟草 (*Nicotiana tabacum*: NTU62735、AF060180)。

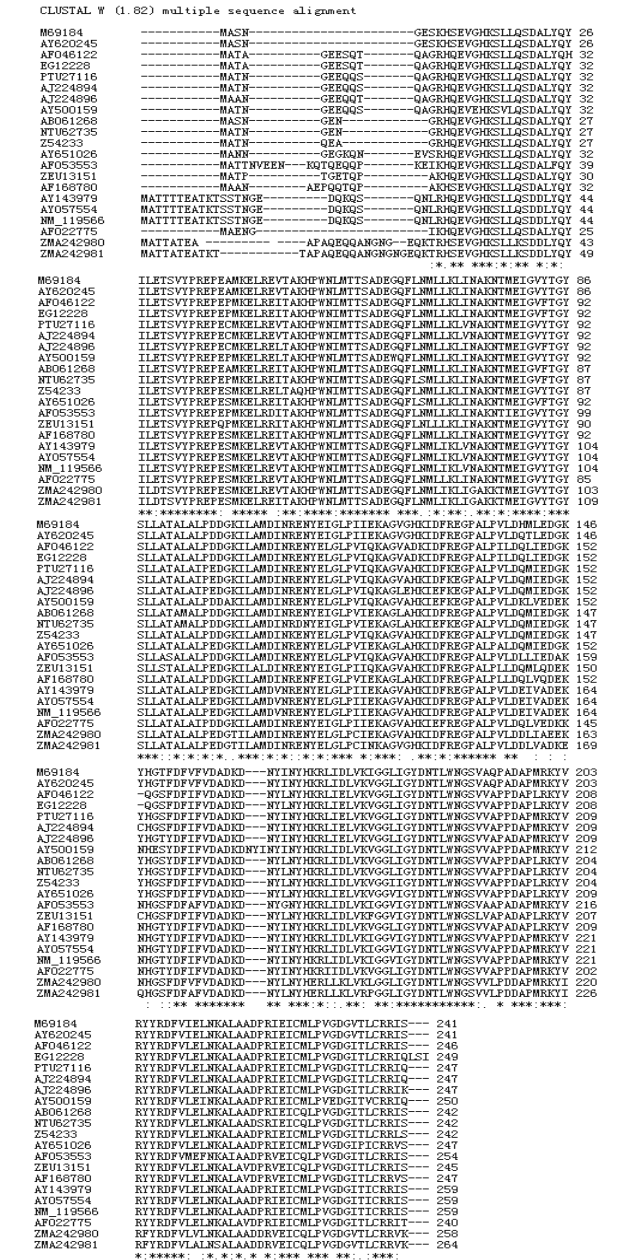


图 3 苕麻 CCoAOMT 基因编码蛋白序列的多序列比较
Fig.3 Clustal W (1.82) multiple sequence alignment of ramie CCoAOMT putative protein amino acid sequence

2.2.4 苧麻 CCoAOMT 基因 mRNA 编码区序列比较与分子进化分析 应用 ClustalW 1.82 软件, 将苧麻 CCoAOMT 基因 mRNA 编码区序列与已报道的其他植物 CCoAOMT 基因 mRNA 编码区序列在线进行多序列比较, 并构建系统树 (图 5)。结果显示, 苧麻

(*Boehmeria nivea*) 的 CCoAOMT 基因 mRNA 编码区序列 (AY651026) 与玉米 (*Zea mays*: ZMA242980、ZMA242981) 的同源性高于其他植物; 与蓝桉 (*Eucalyptus globules*: AF046122、AF168780)、桉树 (*E.gunnii*: EG12228)、欧洲葡萄 (*V. vinifera*: Z54233)

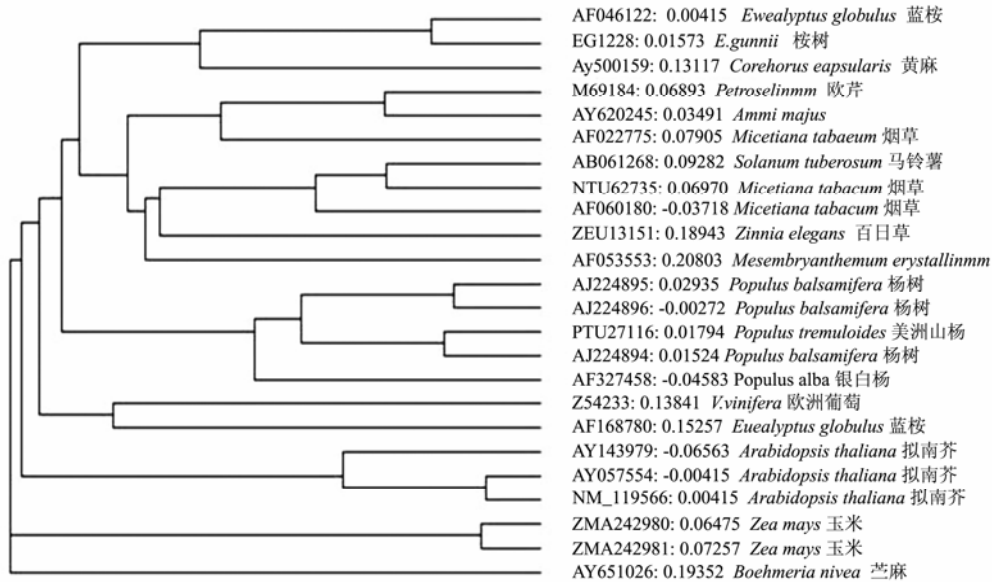


图 4 苧麻与其他高等植物同源的 CCoAOMT 基因 mRNA 序列通过 ClustalW 软件构建系统树

Fig.4 Phylogenetic tree generated by multiple CCoAOMT mRNA sequence of *Boehmeria nivea* and other higher plants through ClustalW

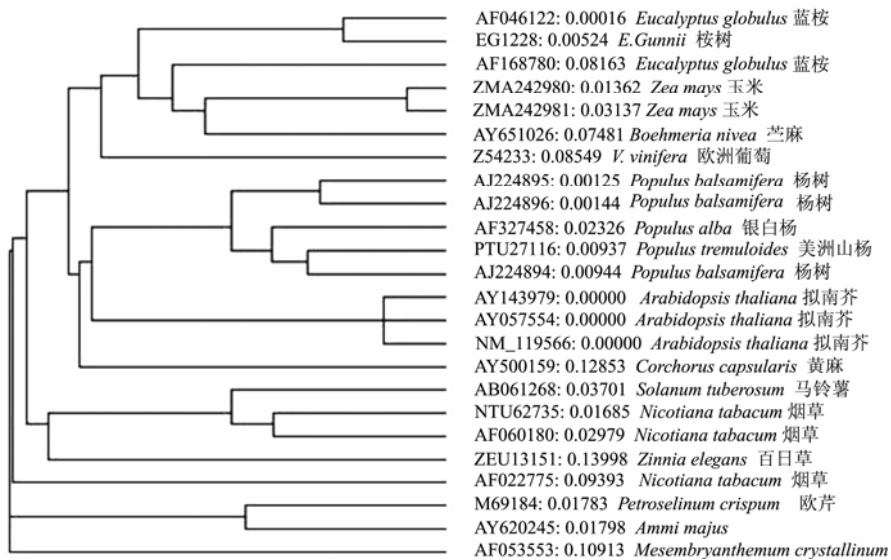


图 5 苧麻与其他高等植物同源的 CCoAOMT 基因 mRNA 编码区序列通过 ClustalW 软件构建系统树

Fig.5 Phylogenetic tree generated by multiple CCoAOMT mRNA CDS sequence of *Boehmeria nivea* and other higher plants through ClustalW

同源性也较高；其次为杨树 (*Populus balsamifera*: AJ224894、AJ224895、AJ224896)、银白杨 (*Populus alba*: AF327458)、美洲山杨 (*Populus tremuloides*: PTU27116)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*: AY143979、AY057554、NM_119566)、黄麻 (*Corchorus capsularis*: AY500159)；而与马铃薯 (*Solanum tuberosum*: AB061268)、烟草 (*Nicotiana tabacum*: NTU62735、AF060180、AF022775)、百日草 (*Zinnia elegans*: ZEU13151)、欧芹 (*Petroselinum crispum*: M69184)、*Ammi majus* (AY620245)、*Mesembryanthemum crystallinum* (AF053553) 的同源性相对较低。

2.2.5 苧麻 CCoAOMT 基因推导酶蛋白氨基酸序列比较与分子进化分析 应用 ClustalW 1.82 软件, 将苧麻 CCoAOMT 基因推导的酶蛋白氨基酸序列与其他植物已报道的相应序列在线进行多序列比较, 并构建系统树 (图 6)。结果显示, 苧麻 (*Boehmeria nivea*) CCoAOMT 酶蛋白氨基酸序列与杨树 (*Populus*

balsamifera: AJ224894、AJ224896)、美洲山杨 (*Populus tremuloides*: PTU27116) 的同源性相对较高; 与蓝桉 (*Eucalyptus globules*: AF168780)、黄麻 (*Corchorus capsularis*: AY500159) 的同源性次之; 与蓝桉 (*Eucalyptus globules*: AF046122)、桉树 (*E. gunnii*: EG12228)、*Mesembryanthemum crystallinum* (AF053553) 的同源性再次之, 而与欧洲葡萄 (*V. vinifera*: Z54233)、马铃薯 (*Solanum tuberosum*: AB061268)、烟草 (*Nicotiana tabacum*: NTU62735、AF060180、AF022775)、杨树 (*Populus balsamifera*: AJ224895)、银白杨 (*Populus alba*: AF327458)、欧芹 (*Petroselinum crispum*: M69184)、*Ammi majus* (AY620245)、百日草 (*Zinnia elegans*: ZEU13151)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*: AY143979、AY057554、NM_119566)、玉米 (*Zea mays*: ZMA242980、ZMA242981) 的同源性相对较低。

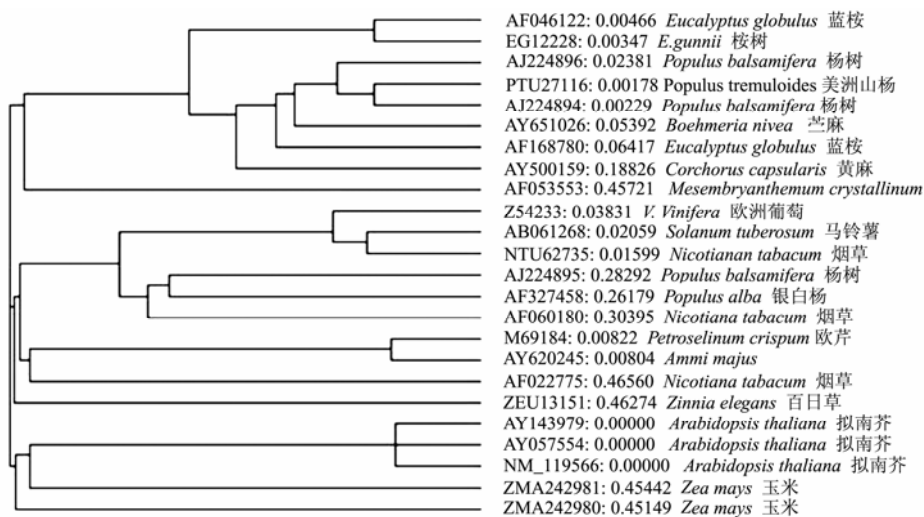


图 6 苧麻与其它高等植物同源的 CCoAOMT 酶蛋白氨基酸序列通过 ClustalW 软件构建系统树

Fig.6 Phylogenetic tree generated by multiple CCoAOMT amino acid sequence of *Boehmeria nivea* and other higher plants through ClustalW

3 讨论

人们常用蛋白质氨基酸序列进行比对构建系统树, 进行分子进化分析。本研究对 mRNA 序列、mRNA 编码区序列以及氨基酸序列 3 种序列进行多重序列比较分析并构建系统树, 发现苧麻的 CCoAOMT 基因 mRNA 序列与已报道的其它植物的相应序列不能聚为一类, 其差异明显大于其它植物间的差异。苧麻的

CCoAOMT 基因 mRNA 编码区序列与玉米 (*Zea mays*: ZMA242980、ZMA242981) 的同源性高于其他植物。苧麻 CCoAOMT 推导的酶蛋白氨基酸序列与杨树 (*Populus balsamifera*: AJ224894、AJ224896)、美洲山杨 (*Populus tremuloides*: PTU27116) 的同源性高于其它植物。三种结果的明显不同反应了同一基因各区段的进化程度可能不同。与基因的功能密切相关的是它所翻译的蛋白质, 可能是人们常用蛋白质氨基酸序列

进行比对构建系统树的原因。

4 结论

苧麻 CCoAOMT 基因全长 cDNA 序列 1080 bp, 其中起始密码子 ATG 位于第 124~126 bp, 终止密码子 TAA 位于第 865~867 bp, 编码区长 247 bp, 编码 247 个氨基酸。苧麻与其他多种高等植物的 CCoAOMT 酶蛋白氨基酸序列在系统进化上有高度保守性。

致谢: 本论文部分工作在湖南农业大学作物基因工程湖南省重点实验室完成, 在此表示感谢。

References

- [1] 李宗道. 苧麻生理生化与遗传育种. 北京: 中国农业出版社, 1998: 9.
Li Z D. *Physiology, Biochemistry, Genetics and Breeding of Ramie*. Beijing: Chinese Agriculture Press, 1998: 9. (in Chinese)
- [2] 魏建华, 宋艳茹. 木质素生物合成途径及调控的研究进展. 植物学报, 2001, 43: 771-779.
Wei J H, Song Y R. Recent advances in study of lignin biosynthesis and manipulation. *Acta Botanica Sinica*, 2001, 43: 771-779. (in Chinese)
- [3] 赵华燕, 魏建华, 宋艳茹. 木质素生物合成及其基因工程研究进展. 植物生理与分子生物学学报, 2004, 30: 361-370.
Zhao H Y, Wei J H, Song Y R. Advances in research on lignin biosynthesis and its genetic engineering. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2004, 30: 361-370. (in Chinese)
- [4] Zhong R, Morrison III W H, Negrel J, Ye Z H. Dual methylation pathway in lignin biosynthesis. *The Plant Cell*, 1998, 10: 2033-2045.
- [5] Meyermans H, Morreel K, Lapierre C, Pollet B, De Bruyn A, Busson R, Herdewijn P, Devreese B, Van Beeumen J, Marita J M, Ralph J, Chen C, Burggraeve B, Van Montagu M, Messens E, Boerjan W. Modifications in lignin and accumulation of phenolic glucosides in poplar xylem upon down-regulation of caffeoyl-Coenzyme A O-methyltransferase, an enzyme involved in lignin biosynthesis. *Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, 275: 36899-36909.
- [6] Zhong R, Morrison III W H, Himmelsbach D S, Poole II F L, Ye Z H. Essential role of caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase in lignin biosynthesis in woody poplar plants. *Plant Physiology*, 2000, 124: 563-578.
- [7] Zhao H Y, Wei J H, Zhang J Y, Liu H R, Wang T, Song Y R. Lignin biosynthesis by suppression of two O-methyltransferase. *Chinese Science Bulletin*, 2002, 47: 1092-1096.
- [8] Ye Z H, Kneusel R E, Matern U, Varner J E. An alternative methylation pathway in lignin biosynthesis in Zinnia. *The Plant Cell*, 1994, 6: 1427-1439.
- [9] Wei J H, Zhao H Y, Zhang J Y, Liu H R, Song Y R. Cloning of cDNA encoding CCoAOMT from *Populus tomentosa* and down-regulation of lignin content in transgenic plant expressing antisense gene. *Acta Botanica Sinica*, 2001, 43: 1179-1183.
- [10] Ye Z H, Varner J E. Differential expression of two O-methyltransferase in lignin biosynthesis in Zinnia elegans. *Plant Physiology*, 1995, 108: 459-467.
- [11] Lu J, Zhao H Y, Wei J H, He Y K, Shi C, Wang H Z, Song Y R. Lignin reduction in transgenic poplars by expressing antisense CCoAOMT gene. *Progress in Natural Science*, 2004, 14: 1060-1063.

(责任编辑 张淑兰)